©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Veränderungen von Plasmaeigenschaften durch Vitalfarbstoffe

Nach Beobachtungen im Hellfeld und im Fluoreszenzlicht

I. Prune pure

Von Anna Fritz

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Juni 1951)

Inhalt.

	Seite
I. Einleitung	789
II. Methodisches	792
Farbstoff und Färbung	792
Beurteilung der Plasmaeigenschaften	794
Objekte und Präparation	796
III. Versuche mit Prune pure	797
Allium cepa L.	798
a) Innenepidermis der Zwiebelschuppen	798
b) Außenepidermis der Zwiebelschuppen	802
Vicia faba L.	807
Daucus carota L.	811
Tradescantia albiflora Kunth.	817
Über die Fluoreszenz des Prune pure	819
1. Zusammenhang zwischen Plasmafluoreszenz lebender Gewebe und Sauerstofftension	819
2. Abhängigkeit der Plasmafluoreszenz vom Lebenszustand der Zellen	820
3. Fluoreszenz der Farblösungen	821
4. Wundrand und Plasmafluoreszenz	822
IV. Zusammenfassung	824
V. Literaturverzeichnis	826

I. Einleitung.

Seit Pfeffers (1886) grundlegenden Untersuchungen ist die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Hellfeldfarbstoffen in viel-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

fältiger Weise bearbeitet worden und hat in Fragen der Aufnahme, Wanderung und Speicherung von Farbstoffen sowie der Intrabilität und Permeabilität der Protoplasten große Bedeutung erlangt. Doch auch zum Zwecke anderer Studien, wie etwa der Anfärbung bestimmter Zellstrukturen am lebenden Objekt, zur Lebensreaktion in physiologischen Untersuchungen usw., hat die Vitalfärbung Verwendung gefunden.

In den letzten Jahrzehnten ist die Anwendung von Fluorochromen neben der von Hellfeldfarbstoffen mehr und mehr in den Vordergrund getreten, wobei sich die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethode in bestimmten Bereichen als überlegen erwiesen hat (hohe Nachweisempfindlichkeit für geringste Farbstoffkonzentrationen und damit im Zusammenhang geringere Schädlichkeit der anzuwendenden Färbung, differente Anfärbung verschiedener Zellstrukturen mit ein und demselben Farbstoff auf Grund der Fluoreszenzmetachromasie u. a. m.). Durch dieses neue Verfahren haben Anatomie wie Physiologie — letztere u. a. im Hinblick auf Stoffleitung, Saftbewegung, Permeabilität, zelluläre Stoffaufnahme und Stoffspeicherung — einen neuen Auftrieb erfahren; schließlich ist es gelungen, über die Empirie hinaus zu kausalem Verständnis der Färbungsphänomene vorzudringen.

In allen Untersuchungen — ob darin nun die Vitalfärbung Hauptgegenstand oder Hilfsmethode ist — spielt die Frage nach der Vitalität und Unschädlichkeit der Färbung eine große Rolle; es stehen diesbezüglich positive wie negative Angaben einander gegenüber, so daß zu erwarten ist, daß, abgesehen von der Beeinträchtigung des Lebenszustandes oder sonstigen sichtbaren Schäden, gewisse wesentliche Eigenschaften des Plasmas durch die Vitalfärbung verändert werden. Es fragt sich, ob solche Änderungen auch dann vorliegen, wenn sich eine Färbung durch Weiterkultur der gefärbten Gewebe als „inturbant" im Sinne der Strugger schen Terminologie (1936) erwiesen hat. Aus der umfangreichen Vitalfärbungsliteratur seien hier einige Beispiele ausgewählt.

Wirkungen der Vitalfärbung auf einzelne physiologische Leistungen der Zelle wurden von mehreren Autoren beobachtet. So findet Beikirch (1925), daß schwache Anfärbung mit Methylenblau, Neutralrot und Chrysoidin auf die Plasmaströmung von *Elodea canadensis* stimulierend wirkt, während stärkere Farbstoffspeicherung dieselbe hemmt. Albach (1929) beschreibt als Folge der Vitalfärbung mit Methylenblau, Neutralrot und Fuchsin S Atmungssteigerung an *Helodea canadensis*, während Chrysoidin und Eosin eine Verminderung bewirken. Ähnlich findet auch Genevois (1928) atmungssteigernde Wirkung verschiedener basischer Farbstoffe an Protococcaceen.

Andere Untersuchungen betreffen die Wirkung der Farbstoffe auf gewisse wesentliche Plasmaeigenschaften, wie Viskosität und Permeabilität bzw. Intrabilität. Über Verminderung der Plasmaviskosität von *Elodeazellen* durch Neutralrotbehandlung berichtet Weber (1929 c). Strugger (1931) führt an der oberseitigen Zwiebelschuppenepidermis von *Allium cepa* Vitalfärbung mit Erythrosin, einem sauren Farbstoff, durch und fand bei KNO_3-Plasmolyse als Folge der Färbung u. a. erhebliche Viskositätszunahme (vgl. auch Küster, 1926), starke Quellung von Plasma und Kernen (was auf Erhöhung der Intrabilität für KNO_3 zurückgeführt wird) und schließlich Verlust dieser Quellungsfähigkeit. Ähnliches ergab sich auch für die Wurzelhaare von *Hydromystria bogotensis*. Höfler (1947, S. 608) beschreibt im Zusammenhang mit Akridinorangefärbung Verminderung der Plasmaviskosität für die Zellen der Innenepidermis von *Allium cepa*. Eingehendere Studien hinsichtlich der Beeinflussung von Plasmaeigenschaften durch die Vitalfärbung hat erstmals Hofmeister (1938) unternommen, welcher die Wirkung von Neutralrot und Methylenblau, zwei Vakuolenfarbstoffen[1], auf die Permeabilität der Blattzellen von *Elodea* für Harnstoff und Gyzerin untersuchte. Dabei ergab sich nach schwacher Anfärbung kein nennenswerter Einfluß (leichte Förderung), jedoch bei stärkerer eine beträchtliche Permeabilitätshemmung; andere, orientierend geprüfte Objekte zeigten zum Teil Hemmung der Harnstoffpermeabilität, zum Teil keinen nennenswerten Einfluß. Später untersuchte Hofmeister (1948 b) die Wirkung des Chrysoidins, eines Plasmafarbstoffes, auf die Permeabilität des Plasmas von *Narcissus pseudonarcissus*, *Solanum tuberosum* und *Daucus carota;* auch diese Untersuchungen zeigten, daß die Vitalfärbung auf die Permeabilität (aber auch auf die Viskosität des Plasmas) ändernd einwirken kann, wobei Höhe und Richtung der Permeabilitätsänderung nach Objekt und Diosmotikum verschieden sind.

Schon die angeführten Beispiele lassen erkennen, daß auch bei voller Vitalität der Färbung Veränderungen einzelner Plasmaeigenschaften möglich sind. Eine durchgehende Gesetzmäßigkeit hat sich jedoch aus der bisherigen Literatur nicht ableiten lassen.

Die vorliegende Untersuchung macht es sich deshalb zur Aufgabe, für verschiedene Farbstoffe und verschiedene Objekte zunächst festzustellen, ob diejenigen Plasmaeigenschaften, die sich quantitativ leicht erfassen lassen, durch die Vitalfärbung verändert werden, ob dies allgemein der Fall ist und in welche Richtung die Veränderungen gehen. Dieser Fragestellung kommt zunächst im Hinblick auf die Verwendung der Vitalfärbung als Hilfsmethode eine gewisse Bedeutung zu. Darüber hinaus wird angestrebt, aus dem Vergleich der mit verschiedenen Farbstoffen und verschiedenen Plasmen gewonnenen Ergebnisse eine Vorstellung darüber zu gewinnen, welche Rolle die Farbstoffe im Plasma spielen.

[1] Inzwischen konnte Strugger (1940 b) zeigen, daß Neutralrot nicht nur in den Vakuolen gespeichert wird, sondern auch im Plasma. Die Plasmafärbung ist allerdings nur bei fluoreszenzmiskroskopischer Beobachtung sichtbar, nicht aber im Hellfeld.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Herrn Doz. Dr. L. Hofmeister, unter dessen Leitung die vorliegende Untersuchung ausgeführt wurde, danke ich bestens für die Stellung des Themas sowie seine stete Anregung und Hilfe. Gleichzeitig möchte ich dem Vorstand des Botanischen Institutes der Universität Wien, Herrn Prof. Dr. L. Geitler, für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut sowie dem Vorstand des Wiener Pflanzenphysiologischen Institutes, Herrn Prof. Dr. K. Höfler, für die Erlaubnis zur Benützung der Fluoreszenzanlage dieses Institutes aufrichtigen Dank sagen.

II. Methodisches.

Bei der Untersuchung der Wirkung einzelner Farbstoffe auf verschiedene Plasmaeigenschaften stand weniger die Erfassung einer absoluten Größe im Vordergrund als vielmehr der Vergleich von gefärbten und ungefärbten Schnitten. Daraus ergab sich insoferne eine methodische Vereinfachung, als etwaige Mängel der einzelnen Methoden weitgehend unberücksichtigt bleiben konnten, doch mußte andererseits ganz besonders auf streng vergleichbares Schnittmaterial innerhalb eines Versuches geachtet werden.

Das Hauptgewicht wurde auf die Prüfung der Viskosität, Permeabilität, Hitzeresistenz und Resistenz des Plasmas gegenüber osmotisch bedingten Volumsänderungen der Protoplasten gelegt. Daneben wurde auch das Färbungsbild beschrieben, Strömung und Konfiguration[2] des Plasmas, Entmischungserscheinungen, morphologische Veränderungen in der Zelle, ferner Beeinträchtigung der Lebensdauer durch die Färbung wie auch die Reversibilität derselben untersucht.

Farbstoff und Färbung.

Als Farbstoff wurde in vorliegender Untersuchung das Prune pure (von Sandoz, Basel) verwendet, für dessen Auswahl die aus der Literatur (Drawert, 1938) bekannte Fähigkeit, das lebende Plasma zu färben, sowie relative Unschädlichkeit maßgebend waren.

Die Farblösungen mußten wegen ihrer geringen Haltbarkeit stündlich erneuert werden, sie wurden in einer Konzentration von 1 10.000 hergestellt und, wenn nicht anders vermerkt, wurde Leitungswasser als Lösungsmittel verwendet. Dieses stammt aus einem Brunnen der Staatsdruckerei in Wien, III., und ist im Gegensatz zum derzeitigen Wiener Hochquellenwasser chlorfrei. Wurden gepufferte Lösungen verwendet, so handelt es sich um $^1/_{150}$ volummolare Phosphatpufferlösungen.

[2] Wenn die Ausdrücke „Plasmafäden“ oder „Plasmastränge“ gebraucht wurden, so sind damit solche gemeint, die die Vakuole durchziehen und nicht etwa Hechtsche Fäden.

Durchführung der Färbung: Von frisch präpariertem Versuchsmaterial wurde die halbe Anzahl der untereinander streng vergleichbaren Schnitte in Farblösung übertragen, der Rest als Kontrolle gleich lang gewässert. Die Vorfärbung der Schnitte währte im allgemeinen bis zu einer deutlichen Anfärbung des Plasmas, oft aber auch kürzer, um im folgenden Versuch nicht vorzeitig zur Schädigung der Zellen zu führen. Aus dem gleichen Grund mußte mitunter auf Vorfärbung gänzlich verzichtet werden; in diesem Fall wurden die präparierten Schnitte direkt in gefärbtes Plasmolytikum eingelegt. Alle Lösungen, in denen gefärbte Schnitte unmittelbar nach ihrer Farbbadbehandlung plasmolysiert wurden, enthielten den Farbstoff in einer Konzentration von 1 : 10.000 gelöst; lediglich in den Hitzeresistenzversuchen wurden die gefärbten Schnitte in Leitungswasser (Pufferlösungen) erhitzt und in ungefärbten (oder im Falle der Kontrollen höchstens mit Neutralrot versetzten) Traubenzuckerlösungen plasmolysiert. Alle Versuche dieser Art werden weiterhin als „Färbungsversuche" den „Entfärbungsversuchen" gegenübergestelllt, in denen gefärbte Schnitte verwendet wurden, deren Entfärbung durch längeres Wässern erzielt oder angestrebt worden war. Die Lösungen in den Entfärbungsversuchen wie auch in allen Kontrollversuchen waren naturgemäß ungefärbt (wenn nicht in den Resistenzversuchen zur Lebensreaktion Neutralrot zugesetzt worden war). Sämtliche Plasmolytika wurden volummolar mit Leitungswasser (Pufferlösungen) hergestellt. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur und diffuser Beleuchtung ausgeführt.

Soweit es sich um Hellfeldbeobachtungen handelt, erfolgte die Beurteilung der Färbung bei Lampenlicht (matte Glühlampe). Die Fluoreszenzversuche wurden mit einer improvisierten UV-Einrichtung gemacht, die aus einer in einem Gehäuse angebrachten Analysen-Quarzlampe S 100, Original Hanau, einem dünnwandigen Glaskolben mit Kupfersulfatlösung und einer gegen ein Opalglasfilter auswechselbaren Schwarzfilterscheibe (Jena, UG 1) bestand. Als Sperrfilter wurde auf das Okular ein Gelbfilter (Reichert, 8017) gelegt. Gelegentlich wurden die mit dieser Einrichtung gemachten Beobachtungen an der vollkommenen Fluoreszenzanlage (Reichert, Lux UV) des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Wien nachgeprüft.

Die genaue Bezeichnung der beobachteten Farben erfolgte durch die Symbole der „Unesma-Farbtafeln" (Ostwaldsche Bezeichnung), die eingeklammert nach der Farbbenennung in Worten angeführt wird. Die mikroskopische Beobachtung der Fluoreszenzfärbung erfolgte durch das Gelbfilter (Reichert, 8017), alle diesbezüglichen Angaben gelten daher für solcherart gesehene Farben.

Zur Unterscheidung der elektroadsorptiven Farbstoffbindung von einer anderen Art der Bindung (etwa der chemischen), wie sie bei der Beurteilung der Färbung gelegentlich nötig war, wurde das vorzügliche Hilfsmittel der Behandlung des zu prüfenden Objektes mit $CaCl_2$-Lösungen herangezogen; durch Adsorptionsverdrängung wird der elektroadsorptiv gebundene Farbstoff ausgewaschen, während chemisch festgelegter nicht verdrängt wird (Boriss, 1937; Pekarek, 1938; Höfler und Stiegler, 1947; Höfler, Toth und Luhan, 1949; Stiegler, 1950).

Zur Feststellung, welche meiner Versuchsobjekte „volle" bzw. „leere" Zellsäfte besitzen, wurde die Akridinorangefärbung mit nachfolgender NH_3-Behandlung, wie sie Höfler (1947, S. 622) angibt, verwendet; demnach hat lediglich die Innenepidermis von *Allium cepa* „leere" Zellsäfte, alle übrigen der von mir untersuchten Objekte aber „volle".

Beurteilung der Plasmaeigenschaften.

Die Beurteilung der Plasmaviskosität erfolgte durchwegs nach der Rundungszeit der Protoplasten (Plasmolysezeit nach Weber) oder nach der Plasmolyseform in Traubenzuckerlösung, zwei Methoden, die auf Weber (1921, 1924, 1925, 1928, 1929 a, b) zurückgehen und deren sich u. a. el Derry (1929), Boriss (1838), Ruge (1940), Fischer (1947, 1949) bedienten. Die Bedenken, die Boriss (1938) und Ruge (1940) dieser Methode der Viskositätsmessung entgegenbrachten, treffen für Relativwerte nicht zu.

In meinen Versuchen wurde von zahlreichen, untereinander streng vergleichbaren Schnitten die halbe Anzahl zur Vorfärbung in Farblösung, der Rest als Kontrolle in Leitungswasser übertragen. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte in gefärbte, die ungefärbten Kontrollen in ungefärbte Traubenzuckerlösung übertragen und die Rundungszeiten der einzelnen Schnitte festgestellt; diese wurde dann als erreicht gewertet, wenn annähernd zwei Drittel der Zellen eines Schnittes konvexe Protoplasten aufwiesen.

Die Permeabilität wurde nach der Deplasmolysezeitmethode ermittelt, einem einfachen und zeitsparenden Verfahren, das Hofmeister (1948 a) auf der Basis der Höflerschen Versuche an Diatomeen (1943) entwickelt hat. Er (Hofmeister, 1948 b, S. 57) arbeitet ausgehend von der bekannten Gleichung $P' = \frac{M}{C - c}$ mit der daraus abgeleiteten Formel $P'_d = \frac{120\,(C - O)}{T\,(C + O)}$. Darin ist T die Deplasmolysezeit in Minuten, O der (plasmometrisch gewonnene) osmotische Wert der Zellen in Traubenzuckerlösung, C die Konzentration des Diosmotikums und P'_d die Permeationskonstante für den Durchschnittswert der Permeation vom Einlegen bis zur Deplasmolyse. P'_d ist dem Wert P' direkt vergleichbar, da der Berechnung beider Konstanten das gleiche Prinzip zugrunde liegt. In meinen Versuchen wurden bei Verwendung der Deplasmolysezeitmethode stets zahlreiche, untereinander streng vergleichbare Schnitte gleichzeitig in das Plasmolytikum (Harnstoff, Glyzerin) eingelegt und der Zeitpunkt der Deplasmolyse knapp vor der völligen Rückdehnung angenommen, wie bei Hofmeister (1948 a) ausgeführt ist. Die Schnittrandzellen wurden wegen ihres durch das Trauma bedingten abweichenden Verhaltens nicht zur Wertung herangezogen.

Außer der deplasmolytischen Methode der Permeabilitätsbestimmung wurde in manchen Fällen (etwa bei vorzeitiger Schädigung der Zellen) zur orientierenden Beurteilung der Permeabilität

gefärbter und ungefärbter Schnitte lediglich der subjektive Vergleich der Plasmolysegrade herangezogen.

Die Hitzeresistenz wurde mit Hilfe des Eintauchverfahrens studiert. Drei kleine Gläschen mit Leitungswasser (Pufferlösung), die zur Aufnahme der Schnitte bzw. eines Thermometers dienten, wurden im improvisierten Wasserbad (einem mit Papier isolierten Becherglas von etwa 2 Liter Inhalt) erhitzt. Nach Vorbehandlung (Wässerung, Färbung) wurden möglichst gleichzeitig in eines der Gläschen sämtliche Kontrollschnitte, in ein zweites alle gefärbten eingelegt. Nach verschieden langen Erhitzungszeiten (Temperaturschwankungen ± 0,3° C) wurden den Gläschen 3—5 Schnitte entnommen und zur weiteren Beobachtung in hypertonische, ungefärbte (bzw. mit Neutralrot gefärbte) Traubenzuckerlösung übertragen.

Resistenz gegen osmotisch bedingte Volumsänderungen der Protoplasten. Es galt, die Resistenz des Plasmas gegen die mechanische Belastung, welche durch Plasmolyse, Deplasmolyse und nochmalige Plasmolyse auftritt, zu prüfen. Dabei gehen in das Versuchsergebnis möglicherweise auch andere Eigenschaften ein, wie etwa die Verträglichkeit der Traubenzuckerlösung (Weis, 1924; u. a.), die Widerstandsfähigkeit gegen die durch die Plasmolyse bedingte Konzentrationszunahme der Zellsaftstoffe (Haberlandt, 1920), die Hypotonieresistenz (Scheitterer und Weber, 1930) oder die Resistenz gegen etwaige Zustandsänderungen des Plasmas, wie Entquellung (Walter, 1923; Karzel, 1926) u. a. m.[3].

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen diente in beiden Resistenzversuchen die Plasmolyse in Traubenzuckerlösung, doch war vielfach eine sichere Beurteilung des Lebenszustandes aus der Plasmolyse allein nicht möglich (vgl. auch Schneider, 1925; Scheibmair, 1937), besonders im Fall krampfartiger Plasmolysen. Mitunter ermöglichte erst eine zweite Beobachtung nach einiger Zeit, während welcher das Plasmolysebild oft deutlicher wurde, eine sichere Diagnose; auch vorsichtiges Zusetzen von Wasser, wobei die Zellen ständig beobachtet wurden, diente dem gleichen Zweck.

Ein weiteres Hilfsmittel zur Beurteilung der Vitalität der Zellen stellt die Neutralrotbehandlung ungefärbter Kontrollschnitte dar (s. a. Strugger, 1949a, S. 156; Scheibmair, 1937; u. a.), wobei lebende Zellen den Farbstoff in der Vakuole speicherten, tote nicht. In den an sich gefärbten Versuchsschnitten unterschieden sich tote und lebende Zellen allgemein durch ihre verschiedene Hellfeldfärbung oder durch ihr Fluoreszenzverhalten im UV-Licht (Strugger, 1940a; Höfler, 1949, S. 25; Strugger, 1949b; u. a.). Ausnahmsweise wurden bei der Prüfung der Resistenz von *Daucus* (s. S. 815) gegen osmotisch bedingte Volumsänderungen gefärbte wie Kontroll-

[3] Wünschenswert wäre die Überprüfung der Resistenz des Plasmas gegen Verlagerung mit Hilfe einer Zentrifuge gewesen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

schnitte kurz mit Pyronin gefärbt, um durch die damit erzielte Vakuolenfluoreszenz der überlebenden Zellen die Auffindung derselben zu erleichtern.

Der Prozentsatz an lebenden Zellen eines Schnittes wurde durch Schätzung bzw. überschlagsweises Auszählen ermittelt.

Allgemein war in den Hitzeresistenzversuchen Neigung zur Krampfplasmolyse zu beobachten; diese Neigung war um so größer, je länger die Schnitte erhitzt worden waren (vgl. auch Scheibmair, 1937) bzw. in den Resistenzversuchen gegen osmotische Volumsänderungen, je größer der Konzentrationsunterschied der verwendeten Lösungen war.

Objekte und Präparation.

Als Hauptversuchsobjekte wurden die beiderseitigen Epidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* L. der gelben Marktsorte „Zittauer Riesen", die Stengelepidermen von *Vicia faba* L. und *Tradescantia albiflora* Kunth. und die Blattstielepidermis von *Daucus carota* L. der Sorte „Verbesserte Nantes" herangezogen.

Das zu den Versuchen verwendete Material wurde jeweils unmittelbar vor der Verwendung frisch präpariert, das Material eines Versuches ist stets streng vergleichbar (zur gleichen Zeit von ein und derselben Pflanze und einem eng begrenzten Zellgebiet präpariert).

Die Präparation der inneren Zwiebelschuppenepidermis von *Allium* erfolgte nach der von Strugger (1935) angegebenen Infiltrationsmethode, von der Außenepidermis wurden nach Infiltration der Schuppe Flächenschnitte hergestellt. Um möglichst einheitliches Material zu gewinnen (vgl. Houska, 1939) wurden in beiden Fällen nur Schnitte von der „Äquatorzone" der 2. oder 3. fleischigen Schuppe (von außen gezählt) ruhender, frostfrei gelagerter und gesunder Zwiebeln mittlerer Größe verwendet.

Von *Vicia* wurde die Epidermis des 3. oder 4. (zumeist jüngsten entwickelten) Stengelinternodiums 15—20 cm hoher Pflanzen präpariert. Sie läßt sich in Streifen mit 2—3 anhaftenden Zellagen abziehen und besteht aus langgestreckten, plasmareichen, in lebhafter Zirkulationsströmung befindlichen Zellen mit nur vereinzelten Chloroplasten. Auffällig war an meinem Material eine leicht schwärzliche Verfärbung nach 1tägiger Wässerung der Schnitte, wobei sämtliche Zellen ohne Zeichen irgendwelcher Schäden lebten. Die Ursache dieser Schwärzung bestand in einem mikroskopisch feinen, krümeligen Überzug der Schnitte. Offenbar war jene Substanz, die den Niederschlag bewirkte, aus den Zellen diffundiert und im Wasser zur Ausfällung gekommen. Möglicherweise stellt die Schwärzung eine Oxydationsfärbung dar (vgl. Pfeffer, 1889).

Von *Daucus* wurde die Epidermis der Blattstiele (Biebl, 1950) von Pflanzen mit nur grundständigen Blättern verwendet. Nach Infiltrieren der Blattstiele wurde die Epidermis in Streifen mit beiderseits anhaftendem Kollenchym schonend abgezogen. In den zylindrisch bis polygonalen Zellen zeigt das schlecht sichtbare Plasma in vereinzelten Plasmasträngen langsame Zirkulationsströmung.

Von *Tradescantia* wurde mit der Epidermis eines Stengelinternodiums (zumeist zwischen dem 3. und 4. Blatt von der Triebspitze gezählt) experimentiert. Zur Erzielung größerer Einheitlichkeit des Versuchsmaterials wurden lediglich die apikalen Hälften der Internodien infiltiert, die Epidermis in Streifen abgezogen und in Schnitte zerteilt. In den sehr regelmäßig zylindrisch gestalteten Epidermiszellen strömte das Plasma in zahlreichen Strängen recht lebhaft. Der völlig strukturlose, stark lichtbrechende Kern zeigte Leukoplastensystrophe.

III. Versuche mit Prune pure.

Der Oxazinfarbstoff Prune pure wurde von Ruhland (1908 a, b, 1912, 1923) in die Vitalfärbungstechnik eingeführt; nach ihm ist der Farbstoff „ziemlich stark kolloidal, dialysiert nur sehr schwer und erscheint ultramikroskopisch in sehr hohem Grade auflösbar". Der Farbstoff liegt im Handel als salzsaures Salz vor (Arnold, 1937): eine wäßrige Lösung desselben erreicht eine hohe, konzentrationsbedingte Azidität, ist unbeständig und flockt aus. Schon Küster (1934) beschreibt, daß die beiden Umschlagspunkte des Prune pure von Rot nach Blau bei p_H 2,7—3,6 und von Blau nach Violett bei p_H 7,3—8,3 liegen. Nach Drawert (1938) wandert der Farbstoff im elektrischen Feld zwischen p_H 1,9—3 zur Kathode und von p_H 8,5—12 zur Anode; von p_H 3—8,5 findet keine Wanderung statt. Der Farbstoff liegt daher zwischen p_H 3—8,5 als elektrisch neutrales Molekül vor und ist nur in diesem Bereich in organischen Lösungsmitteln löslich. Oberhalb und unterhalb dieses Bereiches ist er dissoziiert; er verhält sich unter p_H 3 wie ein basischer Farbstoff (Farbkation), über p_H 8,5 wie ein saurer (Farbanion).

Auch das vitalfärberische Verhalten des Prune pure wurde bereits mehrfach studiert: Ruhland (1908 a, b, 1912, 1923, *Allium cepa*), Schaede (1923, *Allium cepa, Hydrocharis*), Grohrock (1934, S. 333, *Saprolegnia*), Küster (1934, *Allium cepa*), Schönleber (1936, Färbeverhalten zahlreicher Objekte), Bank (1937, Kernfärbung). Küster (1934) wie auch Schönleber (1936) gelangen zu der Ansicht, daß das Plasma erst durch ein — wenn auch schwaches — Trauma mit Prune pure färbbar wird. Drawert (1938) fand wie Ruhland, Schaede und Küster, daß in der Innenepidermis der Zwiebelschuppen ruhender Küchenzwiebeln das Prune pure nur in Plasma und Kernen gespeichert wird, in der Außenepidermis meist nur in den Vakuolen; an austreibenden oder verletzten Zwiebeln beobachtete er auch in der Innenepidermis Farbstoffspeicherung in den Vakuolen, mitunter neben Plasma- und Kernfärbung.

Das Prune pure wurde, soweit mir bekannt, nur als Hellfeldvitalfarbstoff verwendet, welcher Plasma, Kerne und Vakuolen mehr oder minder färben kann. Ich fand jedoch, daß die damit gefärbten Präparate im UV-Licht intensive Plasmafluoreszenz aufweisen können. Es ließ sich zeigen, daß der Farbstoff durch Reduktion[4] in der lebenden Zelle in eine stark fluoreszierende Form übergeht, die im Hellfeld nahezu farblos ist. Von den echten Fluorochromen unterscheidet sich das Prune pure demnach dadurch, daß erstere schon in ihrer wäßrigen Lösung fluoreszieren, das Prune pure jedoch nur im veränderten Zustand. Das untersuchte Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes wird noch eingehend besprochen werden (s. S. 819).

[4] Schon Drawert (1938, S. 193) spricht die Vermutung aus, daß Oxydations- oder Reduktionsvorgänge Veränderungen der Hellfeldfarbe des Prune pure bewirken könnten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Allium cepa L.

In vorliegenden Versuchen an den beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen wurden gepufferte Farblösungen von p_H 7,1 verwendet.

a) Innenepidermis der Zwiebelschuppen („IE").

Färbungsbild. Nach Färbung von 5 Minuten waren die Epidermen makroskopisch in allen Schnitteilen sehr gleichmäßig gefärbt (blauviolett, 14 ec), bei mikroskopischer Betrachtung war noch keine Färbung zu bemerken. Im UV-Licht fiel bereits eine mäßige Fluoreszenz des Plasmas auf.

Nach 10—20 Minuten Färbung hatte sich die makroskopische Hellfeldfärbung etwas verstärkt (14ea) und nunmehr ihr Maximum erreicht: mikroskopisch war eine gleichmäßige und sehr gute Färbung von Plasma[5] und Kern (14ga) zu beobachten, die Nucleoli hatten den Farbstoff zumeist etwas intensiver gespeichert; die Vakuolen und Membranen blieben auch nach längeren Färbezeiten völlig ungefärbt. Plasmakonfiguration und Strömung waren unverändert. Im UV-Licht bot sich nunmehr ein außerordentlich schönes Fluoreszenzbild: Das lebende Plasma fluoreszierte intensiv gelbgrün—grün (22), wodurch die Plasmafäden gegenüber den farblosen Vakuolen scharf hervortraten; Membranen und Kerne fluoreszierten nie. Nach Harnstoff- oder Glyzerinplasmolyse traten in den gefärbten Schnitten gelegentlich Myelinfiguren auf, welche gleichfalls recht intensiv fluoreszierten. Das prächtige Fluoreszensbild erinnerte etwa an das nach Rhodamin-B-Färbung (vgl. Strugger, 1938). Unmittelbar an den Schnitträndern fehlte die Plasmafluoreszenz gänzlich, sie erreichte erst mehrere Zellreihen vom Schnittrand entfernt ihre volle Intensität, was, wie noch gezeigt werden wird, offenbar mit dem erschwerten Sauerstoffzutritt im Schnittinnern zusammenhängt (im Hellfeld waren Plasma und Kerne der Schnittrandzellen etwa gleich intensiv gefärbt wie im Schnittinnern). Nach halbstündiger Färbung hatte sich am Färbungsbild nichts verändert. Etliche Schnittrandzellen zeigten Vakuolenkontraktion, wobei das gequollene Plasma gefärbt war. Während bei starker Kontraktion der Vakuolen Plasmafäden wie auch Strömung fehlten, strömte das Plasma in allen übrigen Zellen bei ungeschädigtem Aussehen. Nach 3stündiger Färbung lebten noch alle Zellen; zum Teil waren Strömung und Konfiguration unverändert, zum Teil war die Strömung verlangsamt und die Zahl

[5] Deutliche Hellfeldfärbung des Plasmas und der Vakuole zeigten auch die Epidermiszellen der Blattrippe von *Taraxacum*.

der Plasmafäden vermehrt. Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigte keine merkliche Veränderung. Niederschläge wurden an der IE nach Prune-pure-Färbung nie beobachtet.

Während in dem verwendeten Zwiebelmaterial die Hellfeldfärbung der IE in zahlreichen Versuchen stets in gleicher Weise reproduziert werden konnte, war die Fluoreszenzfärbung nicht immer gleich intensiv: sie konnte bei verschiedenem Material außerordentlich stark sein bzw. nahezu fehlen. Auch bei Verwendung von Leitungswasser als Lösungsmittel für den Farbstoff war die beschriebene Fluoreszenzfärbung zu erhalten.

Reversibilität der Färbung. Bei Wässerung von 1 Stunde und 3 Stunden 18 Minuten gefärbten Schnitten fiel zunächst auf, daß nach 1tägiger Wässerung im Hellfeld Plasma und Kerne farblos geworden waren und die bis dahin gänzlich farblosen Vakuolen sich schwach blau angefärbt hatten! Bei makroskopischer Betrachtung der Schnitte war die Färbung mehr nach Blau (15) verändert, aber an Intensität gleich. Sämtliche Zellen lebten, manche Schnittrandzellen — mitunter auch einzelne im Schnittinnern — zeigten Vakuolenkontraktion; Plasmafäden waren gegenüber den Kontrollen seltener geworden oder fehlten gänzlich, in allen Zellen strömte aber noch das Plasma, wenn auch langsamer als in den Kontrollen. Im UV-Licht zeigte das im Hellfeld farblose Plasma noch recht kräftige Fluoreszenz (dies selbst noch nach 2tägiger Wässerung). Nach 3tägiger Wässerung lebten von $1^1/_2$ Stunden gefärbten Schnitten noch durchschnittlich 60% der Zellen, von den 3 Stunden 10 Minuten gefärbten nur mehr vereinzelte. Eine vollständige Entfärbung war nicht zu erzielen.

Viskosität.

Im Färbungs- wie im Entfärbungsversuch erwies sich die Viskosität als durch die Färbung stark vermindert. Plasmolyse in den Kontrollschnitten allgemein konkav, in den gefärbten weniger konkav. In letzteren (nicht aber in Kontrollen) Vermehrung und netzartige Verdichtung der Plasmafäden um den Kern. Im Entfärbungsversuch vom 5. 1. 1950 nur noch im UV-Licht Plasmafärbung feststellbar; Plasmolyseform in gefärbten Schnitten konvex, in Kontrollen konkav.

Die durchschnittliche Rundungszeit der gefärbten Schnitte betrug im Färbungsversuch weniger als 70% der Kontrollwerte, im Exosmoseversuch weniger als 41%, was also eine starke Viskositätsverminderung durch die Färbung anzeigt[6], die auch nach weitgehender Auswaschung des Farbstoffes erhalten bleibt.

[6] Viskositätsverminderung durch Prune-pure-Färbung beobachtete ich auch an den Stengelepidermiszellen von *Eranthis hiemalis*.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1[7]

(*Allium*, Innenepidermis; Viskosität.)

Versuchs-datum	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerung nach Färbung	Plasmolytikum in mol Traubenzucker	Rundungszeit in Min.
3. 1. 1950	65 Min.	—	—	0,7	in 8 Schnitten > 75
	5 Min.	65 Min.	—		43, 45, 51, 51, 54, 54, 55, 56, 61 } Mittel 52,2
			—		
			—		
			—		
			—		
			—		
			—		
5. 1. 1950	24 Std.	—	—	0,9	in 8 Schnitten > 40
	10 Min.	1 Std.	23 Std.		14, 15, 15, 16, 16, 16, 17, 18, 20 } Mittel 16,3

Permeabilität. Plasmolyseeintritt in den Kontrollen konkav, in den gefärbten Schnitten konvex. Gelegentlich Myelinfiguren; solche vereinzelt auch in plasmolysierten Kontrollschnitten. In gefärbten wie gewässerten Schnitten bis Versuchsende Plasmaströmung, keine Schädigung.

Der durchschnittliche Permeabilitätswert der gefärbten Schnitte betrug im Harnstoffversuch 53% der Kontrollwerte, im Glyzerinversuch weniger als 75%; demnach wurde durch die Färbung die Permeabilität für beide Substanzen stark herabgesetzt[8].

[7] In allen Tabellen gelten die Angaben über Rundungs- oder Deplasmolysezeiten bzw. Prozente der überlebenden Zellen jeweils für einen Schnitt.

[8] Gleiches ergaben auch orientierende Versuche an den Stengelepidermiszellen von *Eranthis hiemalis*.

Tabelle 2.

(*Allium*, Innenepidermis; Permeabilität.)

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'_d	
5.1.1950	0,8 Harnstoff (ungefärbt)	0,580	1 Std. 15 Min.	—	25	0,763	Mittel 0,666
				—	25	0,763	
				—	27	0,708	
				—	29	0,660	
				—	29	0,660	
				—	30	0,638	
				—	33	0,579	
				—	40	0,478	
	0,8 Harnstoff (gefärbt)		5 Min.	1 Std. 15 Min.	40	0,478	Mittel 0,349
					47	0,410	
					49	0,391	
					57	0,336	
					60	0,322	
					62	0,309	
					68	0,281	
					72	0,266	
20.1.1950	0,65 Glyzerin (ungefärbt)	0,469	1 Std. 25 Min.	—	86	0,226	Mittel 0,166
				—	105	0,185	
				—	105	0,185	
				—	120	0,162	
				—	141	0,138	
				—	139	0,139	
				—	148	0,131	
	0,65 Glyzertn (gefärbt)		10 Min.	1 Std. 25 Min.	10 Schn. >155	10 Schnitte < 0,125	

Hitzeresistenz.

In den gefärbten und erhitzten Schnitten weniger stark konkave Plasmolyse als in Kontrollen. Plasmaströmung und Plasmafäden fehlen. Nach Erhitzung ist die Färbung von Plasma und Kernen in überlebenden Zellen im Hellfeld unverändert, im UV-Licht stark gemindert.

Wie die Tabelle zeigt, wurde die Hitzeresistenz durch die Färbung stark herabgesetzt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 3.

(*Allium*, Innenepidermis; Hitzeresistenz.)

Temperatur: 56—56,6° C; Plasmolyse in 0,7 mol Traubenzucker.

Versuchs-datum	Dauer der		% der überlebenden Zellen nach Erhitzungsdauer von	
	Wässerung	Färbung	2 Min.	4 Min.
12. 1. 1950	1 Std. 33 Min.	—	60	< 1
		—	30	< 1
		—	40	< 1
		—	50	< 1
		—		< 1
		—		0
			Mittel 45	Mittel < 1
	8 Min.	1 Std. 26 Min.	2	0
			5	0
			3	0
			7	
			5	
			Mittel 4,5	

Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen. Die Ergebnisse dieses Versuches (1stündige Vorbehandlung, 1. und 2. Plasmolyse in 0,8 mol Traubenzucker, Deplasmolyse in Leitungswasser — bei gefärbten Schnitten in Farblösung — bzw. in 0,2 und 0,4 molaren Zuckerlösungen) waren uneinheitlich. Auf ihre Mitteilung im einzelnen wird verzichtet. Bei umfangreicherer Untersuchung dürfte sich geringe Verminderung der Resistenz durch die Färbung ergeben.

b) Außenepidermis der Zwiebelschuppen („AE").

Färbungsbild. Nach Färbung von 20—30 Minuten waren im Hellfeld die Vakuolen der Schnittrandzellen intensiv blau (17 ia) gefärbt, die im Schnittinneren nur sehr blaß oder gar nicht; in einzelnen Randzellen war Vakuolenkontraktion zu beobachten. Plasma und Kerne erwiesen sich im Hellfeld meist ungefärbt, mitunter zeigten aber nahezu alle Zellen recht intensive Hellfeldfärbung von Plasma und Kernen, wobei stets lebhafte Plasmaströmung und völlig ungeschädigtes Aussehen zu beobachten war. Die Plasma- und Kernfärbung wies den gleichen blauvioletten Farbton (14) wie in der IE auf, die Vakuolen waren aber stets tiefblau (17) gefärbt (vgl. Schaede, 1923)[9]. Im UV-Licht konnte an

[9] Ähnliches Färbeverhalten zeigte die Stengelepidermis von *Eranthis hiemalis;* überraschenderweise waren auch die Schnittrandmembranen leicht

allen Schnitten — gleichgültig ob mit oder ohne Hellfeldfärbung von Plasma und Kernen — eine deutliche grüne (22) Fluoreszenz des Plasmas (nicht aber der Kerne) beobachtet werden, die zumeist weniger intensiv war als die der IE, in manchen Fällen aber beträchtlich stärker als diese; im Gegensatz zum Plasma fluoreszierten die im Hellfeld blau gefärbten Vakuolen nie, auch Membranfluoreszenz fehlte. Wie der IE, so fehlte auch der AE an den Schnitträndern Plasmafluoreszenz. Nach $^5/_4$- bis $1^1/_2$stündiger Färbung zeigten die Schnitte im Hellfeld — je nach Schnittdicke — entweder schon in allen Teilen annähernd gleich intensive Vakuolenfärbung oder aber an den Schnitträndern noch bedeutend stärker als im Innern. Nach 3stündiger Färbung waren die Vakuolen sämtlicher Zellen recht intensiv gefärbt (17 la), die des Schnittrandes nur wenig stärker. Sämtliche Zellen zeigten Plasmaströmung und völlig ungeschädigtes Aussehen (auch bei Vorhandensein von Plasma- und Kernfärbung). An der beschriebenen Hellfeld- wie Fluoreszenzfärbung hatte sich nichts geändert.

Niederschläge waren nach Prune-pure-Färbung in den beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen nie zu beobachten.

Reversibilität der Färbung. Nach Färbung von 1 Stunde 15 Minuten und 3 Stunden 18 Minuten (in einem Teil der Zellen waren neben den Vakuolen auch Plasma und Kerne gefärbt, in einem anderen lediglich die Vakuolen) wurden zahlreiche Schnitte in Leitungswasser übertragen. Nach 1- wie nach 3tägiger Wässerung lebten sämtliche Zellen bei Plasmaströmung und ungeschädigtem Aussehen, die Vakuolen hatten kaum Farbstoff abgegeben. Kern und Plasma waren in allen Fällen schon nach 1tägiger Wässerung im Hellfeld vollkommen entfärbt, das Plasma fluoreszierte aber im UV-Licht noch recht ansehnlich.

Viskosität. Im Färbungsversuch vom 4. 1. 1950 nach 1stündiger Vorfärbung Vakuolen aller Zellen gut gefärbt, im Verlauf des Versuches Färbung auch auf Plasma und Kerne übergreifend. Plasmolyseeintritt in gefärbten wie Kontrollschnitten konkav, Plasmafäden und Strömung (letztere in gefärbten Schnitten langsamer als in Kontrollen) bis Versuchsende zu beobachten. Im Entfärbungsversuch vom 5. 1. 1950 in Kontrollschnitten nach Plasmolysedauer von 70 Minuten konkave Plasmolyseformen, in gefärben Schnitten konkave bis konvexe.

violett gefärbt (Küster, 1934; Drawert, 1938, S. 184), was wohl auf Imbibition der Membranen mit aus den absterbenden Zellen herausdiffundierenden Zellsaftstoffen beruhen dürfte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wie Tabelle 4 zeigt, wurde die Plasmaviskosität der AE durch die Färbung im Färbungs- wie im Entfärbungsversuch (in beiden Fällen fluoreszierte das Plasma) schwach bis mäßig herabgesetzt.

Tabelle 4.

(*Allium*, Außenepidermis; Viskosität.)

Versuchs-datum	Dauer der			Plasmolytikum in mol Traubenzucker	Rundungszeit in Min.
	Wässerung	Vorfärbung	Wässerung nach Färbung		
4. 1. 1950	1 Std.	—	—	0,7	65
		—	—		68
		—	—		68
		—	—		75
		—	—		77 } Mittel 80
		—	—		88
		—	—		90
		—	—		90
		—	—		99
	10 Min.	1 Std.	—		50
			—		55
			—		57
			—		75 } Mittel 72
			—		82
			—		82
			—		85
			—		95
5. 1. 1950	25 Std. 20 M.	—	—	0,9	in 8 Schnitten nach 70 Min. noch typisch konkav
	10 Min.	1 Std.	24 Std. 20 M.		in 6 Schnitten nach 70 Min. noch schwach konkav

Permeabilität. In beiden Versuchen der Tabelle 5 konkaver-konvexer Plasmolyseeintritt. Zu Versuchsbeginn in allen Zellen gute Plasmafluoreszenz, Hellfeldfärbung des Plasmas erst im Verlauf des Versuches.

Im Harnstoffversuch waren die gefärbten Schnitte nach 100, im Glyzerinversuch noch nach 120 Minuten mäßig-stark plasmolysiert, so daß die Permeabilität für beide Substanzen durch die Färbung im Vergleich zu den Kontrollen stark vermindert ist.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 5.

(*Allium*, Außenepidermis; Permeabilität.)

Versuchsdatum	Plasmolylikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'_d
5. 1. 1950	0,9 Harnstoff (ungefärbt)	0,478	1 Std. 30 Min.	—	85	0,432
				—	86	0,437
				—	87	0,422
				—	87	0,422
				—	88	0,417
				—	92	0,399
				—	92	0,399
				—	94	0,390
				—	100	0,367
						Mittel 0,408
	0,9 Harnstoff (gefärbt)		10 Min.	1 Std. 30 Min.	8 Schn. > 100	8 Schnitte < 0,367
20. 1. 1950	0,65 Glyzerin (ungefärbt)	0,451	2 Std.		75	0,291
					90	0,243
					95	0,229
					102	0,214
					104	0,210
					110	0,197
					115	0,190
					117	0,186
						Mittel 0,220
	0,65 Glyzerin (gefärbt)		15 Min.	2 Std.	8 Schn. > 120	8 Schnitte < 0,182

Tabelle 6.

(*Allium*, Außenepidermis; Hitzeresistenz.)

Temperatur: 60—60,5° C, Plasmolyse in 0,7 mol Traubenzucker.

Versuchsdatum	Dauer der Wässerung	Dauer der Färbung	% der überlebenden Zellen nach Erhitzungsdauer von: 3 Min.	5 Min.	7 Min.
13. 1. 1950	1 Std. 43 Min.	—	98	1	1
		—	90	5	0
		—	80	1	0
		—	80	10	
			Mittel 87	Mittel 4,2	Mittel 1
	10 Min.	1 Std 34 Min.	70	0	0
			60	10	0
			60	15	0
			80	20	0
			90		
			Mittel 72	Mittel 11	Mittel 0

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Hitzeresistenz. Der in Tabelle 6 dargestellte Versuch wie auch 2 orientierende ergaben keine nennenswerte Beeinflussung der Hitzeresistenz.

Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, war unter den angeführten Versuchsbedingungen eine Veränderung der Resistenz durch die Färbung nicht zu erkennen.

Tabelle 7.

(*Allium*, Außenepidermis; Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen.)

Versuchsdatum	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	1. Plasmolyse (in mol Traubenzucker)	Deplasmolyse (in mol Traubenzucker)	2. Plasmolyse (in mol Traubenzucker)	% der überlebenden Zellen
21.1.1950	2 Std.	—	2,0	Pufferlsg.	0,8	90, 80, 95, 97 — Mittel 90
		—				
		—				
	15 Min.	2 Std.				90, 50, 40, 70 — Mittel 62
	2 Std.	—		0,2		100, 95, 80 — Mittel 91
		—				
		—				
	15 Min.	2 Std.				100, 95, 95, 85 — Mittel 94
	2 Std.	—		0,4		100, 95, 60 — Mittel 85
		—				
		—				
	15 Min.	2 Std.				100, 95, 95, 90 — Mittel 95

Vicia faba L.

Färbungsbild[10]. Färbung von 15—20 Minuten bewirkte schwache Anfärbung im Schnittinneren, etwas stärkere an den Rändern. Die Farbstoffspeicherung erfolgte in den Vakuolen lebender Zellen auch nach langen Färbezeiten nur diffus, dagegen bildeten sich krümelige Niederschläge nur in toten Randzellen[11]. Nach 30 Minuten Färbung war die Gesamtfärbung der Schnitte intensiver geworden, neben Speicherung in den Vakuolen machte sich nunmehr auch eine solche im Plasma der Schnittrandzellen bemerkbar[12]; die Plasmaströmung war gegenüber den Kontrollen etwas verlangsamt. Nach 1stündiger Farbbadbehandlung hatte sich die Färbung abermals verstärkt und erreichte nach weiteren 30 Minuten das Maximum. Nunmehr waren in sämtlichen Zellen Vakuolen und Plasma gleichmäßig gefärbt, die Vakuole bedeutend intensiver als das Plasma; die Membranen waren farblos, ob die Kerne gefärbt waren, ließ sich nicht entscheiden. Plasmaströmung war zu beobachten, erlosch aber nach 3stündiger Färbung.

Reversibilität der Färbung. Beim Übertragen von gefärbten (27 Minuten bis über 3 Stunden) Schnitten in Wasser setzte die Farbstoffexosmose sofort ein, die Entfärbung lebender Zellen ging jedoch nur bis zu einer schwach blaugrünen Färbung[13]; erst tote Zellen entfärbten sich vollständig. Von 1stündig gefärbten Schnitten lebten nach 2tägiger Wässerung noch etwa 80% der Zellen, von 3 Stunden 20 Minuten gefärbten waren nach der gleichen Zeit sämtliche Zellen tot (von den 2 Tagen gewässerten Kontrollschnitten lebten sämtliche Zellen bei lebhafter Plasmaströmung).

[10] Wenn nicht eigens erwähnt, beziehen sich alle Angaben auf Hellfeldfärbung.

[11] Auch in toten Stengelepidermiszellen von *Eranthis hiemalis* und *Tradescantia albiflora* beobachtete ich nach Prune-pure-Färbung Niederschläge. In lebenden Zellen bildeten sich krümelige Niederschläge nach Prune-pure-Behandlung in *Spirogyra*-Zellen.

[12] Einer gelegentlichen Beobachtung zufolge zeigte 40 Minuten gefärbtes (1 : 10.000, Leitungswasser) Schnittmaterial vom 15. 9. 1950 im UV-Licht deutliche Kern- und Plasmafluoreszenz, die sich bei Sauerstoffmangel (Deckglasabschluß) verstärkte, wobei im Hellfeld Entfärbung der Schnitte eintrat.

[13] Schönleber (1936, S. 318) beschreibt blaugrüne-grünblaue Färbung in den verschiedenen Zonen einer mit Prune pure gefärbten Wurzelspitze von *Allium cepa* und betont, daß dies keine Farbe ist, die der Farblösung in irgendeiner Aziditätslage entspricht. Vielleicht läßt sich diese Beobachtung durch die von Drawert (1938) ausgesprochene Vermutung verstehen, wonach das Prune pure durch Oxydations- oder Reduktionsvorgänge eine Veränderung seiner Hellfeldfarbe erfahren dürfte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Viskosität.

Tabelle 8.

(*Vicia;* Viskosität.)

Versuchsdatum	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerung nach Färbung	Plasmolytikum in mol Traubenzucker	Rundungszeit in Min.
29. 7. 1949	90 Min.	—	—	0,5 (ungef.)	130, 133, 145, 151, 160, 170, 182, 185, 210, 210 *Mittel: 167,6*
	15 Min.	90 Min.	—	0,5 (gefärbt)	20, 20, 24, 22, 25, 25, 25, 27, 27, 28 *Mittel: 24,3*
30. 7. 1949	30 St. 25 Min.	—	—	0,5 (ungef.)	17, 22, 27, 29 *Mittel: 23,7*
	15 Min.	1 St. 30 Min.	28 St. 41 Min.		8, 8, 10, 10, 11 *Mittel: 9,4*
29. 7. 1949	5 Min.	—	—		40, 40, 40, 35, 35, 42, 49, 53, 57, 65 *Mittel: 45,6*
	6 Min.	—	—	0,5 (gefärbt)	20, 20, 22, 22, 22, 24, 31, 35, 41, 43 *Mittel: 27,9*

Plasmolyseeintritt in gefärbten und „entfärbten" Schnitten meist imperfekt konvex, in den Kontrollen konkav. Bis Versuchsende keine Schädigung. Die starke Viskositätsverminderung durch die Färbung, die in den Plasmolyseeintrittsformen zum Ausdruck kommt, wird durch die Rundungszeiten bestätigt.

Permeabilität.

Tabelle 9.

(*Vicia;* Harnstoffpermeabilität).

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerg. nach Färbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'd	
28. 7. 1949	0,5 Harnstoff (ungefärbt)	0,336	15 Min.	—	—	3 Schn.	3 Schnitte	
				—	—	<17	>1,385	
				—	—	4 Schn.	4 Schnitte	
				—	—	<18	>1,31	
				—	—	20	1,17	
				—	—	20	1,17	
				—	—	23	1,03	
	0,5 Harnstoff (gefärbt)			15 Min.	—	20	1,17	Mitt. 0,879
					—	22	1,07	
					—	25	0,945	
					—	25	0,945	
					—	26	0,911	
					—	28	0,845	
					—	30	0,785	
					—	30	0,785	
					—	33	0,717	
					—	32	0,738	
					—	31	0,763	
	0,6 Harnstoff (ungefärbt)	—	25 Std.	—	—	<57		
		—		—	—	58		
		—		—	—	58		
		—		—	—	<107		
	0,6 Harnst. (ungefärbt)	—	11 Min.	1 Std. 19 Min.	23 Std. 21 Min.	4 Schn. >117		

In allen Permeabilitätsversuchen im plasmolysierten Zustand unveränderte Plasmakonfiguration und Strömung allgemein zu beobachten, lediglich in vereinzelten gefärbten Schnitten des Färbungsversuches (nicht aber des Entfärbungsversuches) gegen Versuchsende leichte Schädigungen. Die Versuche der Tabellen 9 u. 10 sowie einige orientierende, hier nicht mitgeteilte Versuche, zeigen im Färbungs- wie im Entfärbungsversuch starke Verminderung der Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin durch die Färbung[14].

Bemerkenswert erscheint mir eine gelegentliche Beobachtung an *Vicia,* wonach in einzelnen Schnitten trotz verschieden intensiver Anfärbung von Randzellen und Innenzellen beide Zellgebiete gleich starke Hemmung der Harnstoffpermeabilität zeigten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 10.

(*Vicia;* Glyzerinpermeabilität.)

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerung n. Färbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'd	
26.7.1949	0,8 Glyzerin (ungefärbt)	0,298	30 Min.	—	—	12	4,57	Mittel 3,256
				—	—	12	4,57	
				—		14	3,92	
				—	—	18	3,05	
				—	—	19	2,89	
				—	—	22	2,49	
				—	—	25	2,20	
				—	—	23	2,36	
	0,6 Glyzerin (gefärbt)		20 Min.	30 Min.		22	1,835	Mittel 1,629 = 50% vom Kontrollwert
					—	25	1,611	
					—	25	1,611	
					—	20	2,01	
					—	20	2,01	
					—	24	1,68	
					—	33	1,22	
					—	38	1,062	
27.7.1949	0,6 Glyzerin (ungefärbt)		24 Std. 25 M.	—	—	26	1,55	Mittel 1,146
				—	—	26	1,55	
				—	—	30	1,345	
				—	—	36	1,12	
				—	—	36	1,12	
				—	—	34	1,186	
				—	—	37	1,09	
				—	—	55	0,733	
				—	—	65	0,620	
	0,6 Glyzerin (ungefärbt)		20 Min.	1 Std. 20 Min.	26 Std. 21 M.	69	0,584	Mittel 0,484 =42,2% vom Kontrollwert
						79	0,510	
						79	0,510	
						82	0,492	
						85	0,474	
						85	0,474	
						85	0,474	
						94	0,429	
						97	0,416	

Hitzeresistenz. Nach Vorbehandlung (Wässerung, Färbung) von $^5/_4$ Stunden, Erhitzen bei 51,8—52,2° C durch 3 bis 9 Minuten und folgender Plasmolyse in 0,4 mol Traubenzucker zeigte sich (wie auch in einem ähnlichen Versuch) kein Unterschied in der Hitzeresistenz gefärbter und gewässerter Schnitte.

Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, wurde in allen Fällen übereinstimmend die Resistenz durch die Färbung ansehnlich vermindert.

Tabelle 11.

(*Vicia;* Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen.)

Versuchsdatum	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	1. Plasmolyse	Deplasmolyse	2. Plasmolyse	% der überlebenden Zellen
			in mol Traubenzucker			
29.7.1949	30 Min.	—	0,7	Leit.-Wasser	0,7	87
		—				85 Mittel 72
		—				76
		—		„		41
	10 Min.	30 Min.		Farblösg.		15
						10 Mittel 8,7
						0
	30 Min.	—		0,1		100
		—				90 Mittel 77
		—				82
	„	—				39
	10 Min.	30 Min.				70
						54 Mittel 52
						44
	„					40
	30 Min.	—		0,2		87
		—				85 Mittel 87
		—				94
		—				81
	10 Min.	30 Min.				73
						65 Mittel 61,5
						56
						52

Daucus carota L.

Färbungsbild[15]. $^1/_2$—1stündige Färbung bewirkte nur sehr schwache Anfärbung[16]; Plasmaströmung fehlte. Nach 2stündiger Färbung geringfügige Verstärkung der Färbungsintensität,

[15] Alle Angaben gelten für Hellfeldfärbung.

[16] Mit Prune pure färbte sich auch die Stengelepidermis von *Eranthis* nur sehr langsam. Die Blattstielepidermis von *Amaryllis* und die Stengelepidermis von *Begonia punctata* blieben gänzlich farblos (vgl. Schönleber, 1936).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

jedoch Färbungsmaximum erreicht. In Vakuolen der lebenden Zellen nur diffuse Farbstoffspeicherung, in toten auch Krümel und Membranfärbung (Drawert, 1938, S. 184). Ob außer Kappenplasma auch unverändertes Plasma das Prune pure speichert, konnte nicht festgestellt werden. Färbung bis zu 23 Stunden brachte keine Änderung des beschriebenen Färbungsbildes, sämtliche Zellen lebten ohne Zeichen von Schädigung.

Tabelle 12.

(*Daucus;* Viskosität.)

Versuchs-datum	Dauer der			Plasmolytikum in mol Traubenzucker	Rundungs-zeit in Min.
	Wässerung	Vorfärbung	Wässerung nach Färbung		
26. 9. 1949	2 Std. 15 Min.	—	—	0,7	10 } Mittel 20,7
		—	—		10
		—	—		11
		—	—		12
		—	—		26
		—			29
		—	—		47
	10 Min.	2 Std. 21 Min.	—		in 4 Schn. konvexer Plasmolyseeintritt
28. 9. 1949	26 Std.	—		0,8	10 Schnitte > 145
	10 Min.	1 Std. 58 Min.	24 Std. 2 Min.		12 } Mittel 41,3
					13
					20
					29
					40
					70
					105
					(130)
1. 10. 1949	94 Std. 10 M.	—	—	1,2	6 Schnitte > 85
	10 Min.	1 Std. 58 Min.	92 Std. 7 Min.		12 } Mittel 36
					14
					25
					35
					37
					32
					58
					75

Reversibilität der Färbung. Nach Färbung von 3 Stunden änderte sich die Blaufärbung beim Übertragen in Wasser allmählich nach Blaugrün, ohne an Intensität merklich abzunehmen (vgl. S. 807). Nach 13tägiger Wässerung lebten von diesen Schnitten noch durchschnittlich 67%, von den Kontrollen noch etwa 80%. Demnach vermögen gefärbte Schnitte bei anschließender Wässerung trotz Irreversibilität der Färbung noch lange zu leben.

Viskosität.

Der Vergleich der Plasmolyseeintrittsformen (gefärbte Schnitte: imperfekt konvex, Kontrollen: konkav) sowie der Rundungszeiten ergab im Färbungs- und im Entfärbungsversuch (bei völlig ungeschädigtem Aussehen der Zellen) starke Viskositätsverminderung durch die Färbung.

Permeabilität.

Tabelle 13.

(*Daucus;* Harnstoffpermeabilität.)

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerg. nach Färbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'd	
27. 9. 1949	1,2 Harnstoff (ungefärbt)	0,547	2 Std.	—	—	10	4,49	Mittel 2,577
				—	—	15	3,01	
				—	—	18	2,51	
				—	—	18	2,51	
				—	—	21	2,15	
				—	—	24	1,89	
				—	—	31	1,48	
	1,2 Harnstoff (gefärbt)		10 Min.	2 Std.	—	20	2,24	Mittel 1,378
					—	24	1,89	
					—	28	1,60	
					—	38	1,18	
					—	40	1,14	
						55	0,817	
		,,			—	60	0,784	
	1,2 Harnstoff (ungefärbt)	0,403	92 Std. 40 Min.	—	—	157	0,379	Mittel 0,339
				—	—	165	0,362	
				—	—	165	0,362	
				—	—	167	0,356	
				—	—	192	0,310	
				—		187	0,318	
				—	—	207	0,288	
	1,2 Harnst. (ungefärbt)		7 Min.	2 Std. 4 Min.	90 Std. 45 Min.	10 Schn. > 240	10 Schnitte < 0,248	

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bis zum Ende der Permeabilitätsversuche keine Schädigungen. Farbspeicherung aus gefärbtem Plasmolytikum stärker als aus gewöhnlicher Farblösung (vgl. Beobachtung Scarths, 1926, an sauren Farbstoffen), so daß selbst Plasma deutlich gefärbt. Elektiv gefärbte Schließzellen auffallend turgeszent.

In den Versuchen der Tabellen 13 und 14 setzte die Färbung die Permeabilität für Harnstoff und Glyzerin im Färbungs- wie im Entfärbungsversuch stark herab, für Glyzerin stärker als für Harnstoff.

Tabelle 14.

(*Daucus;* Glyzerinpermeabilität.)

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Dauer der Wässerg. nach Färbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'_d	
28. 9. 1949	0,9 Glyzerin (ungefärbt)	0,527	2 Std.	—	—	22	1,44	Mittel 1,262
				—	—	23	1,363	
				—	—	23	1,363	
				—	—	24	1,307	
				—		24	1,307	
				—	—	24	1,307	
				—	—	25	1,252	
				—	—	27	1,155	
				—	—	29	1,083	
			,,	—	—	30	1,044	
	0,9 Glyzerin (gefärbt)		10 Min.	2 Std.	—	44	0,712	Mittel 0,506
					—	45	0,697	
					—	51	0,615	
					—	62	0,505	
					—	60	0,522	
					—	72	0,433	
					—	80	0,392	
,,					—	93	0,338	
,,			,,		—	90	0,348	
29. 9. 1949	0,8 Glyzerin (ungefärbt)		29 Std. 40 Min.	—	—	11	2,25	Mittel 2,07
						13	1,90	
			10 Min.	2 Std. 4 Min.	27 Std. 8 Min.	7 Schn. > 60	7 Schnitte < 0,412	

Hitzeresistenz.

Die Versuche der Tabellen 15 und 16 ergaben im Färbungs- wie im Entfärbungsversuch in allen Fällen übereinstimmend starke Verminderung der Hitzeresistenz durch die Färbung.

Tabelle 15.

(*Daucus;* Hitzeresistenz.)

Temperatur: 55,7—56,5° C; Plasmolyse in 0,8 mol Traubenzucker (im Fall der Kontrollschnitte mit Neutralrotzusatz).

Versuchsdatum	Dauer der		% der lebenden Zellen nach Erhitzen von		
	Wässerung	Färbung	3 Min.	5 Min.	7 Min.
3. 10. 1949	1 Std. 30 Min.	—	100	56	0
		—	100 } Mittel 100	50 } Mittel 64	0 } Mittel 0
		—	100	86	0
	10 Min.	1 Std. 21 Min.	65	0	0
			57 } Mittel 58	5 } Mittel 1,7	0 } Mittel 0
			58	0	0

Tabelle 16.

(*Daucus;* Hitzeresistenz.)

Versuchsdatum: 4. 10. 1949. Temperatur: 55,2—55,5° C. Plasmolyse in 0,8 mol Traubenzucker (mit Neutralrotzusatz).

Dauer der			% der lebenden Zellen nach Erhitzen von			
Wässerung	Färbung	Wässerung n. Färbung	2 Min.	4 Min.	6 Min.	8 Min.
19 Std. 30 Min.	—	—	100	100	100	69
	—	—	100 } Mittel 100	99 } Mittel 99	100 } Mittel 99	44 } Mittel 45
	—	—	100	98	97	23
10 Min.	1 Std. 18 Min.	18 Std. 3 Min.	100	95	78	0
			99 } Mittel 99,5	95 } Mittel 96	48 } Mittel 54	0 } Mittel 1,7
			—	98	37	5

Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen. Zur Lebensreaktion gefärbte wie gewässerte Schnitte nach 2. Plasmolyse in Pyroninlösung (siehe S. 795). In ersteren trotz bestehender Prune-pure-Färbung der Vakuolen lebender Zellen nunmehr auch Pyroninspeicherung, kenntlich am Auftreten grüner Vakuolenfluoreszenz im UV-Licht (in toten Zellen fehlend).

Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, wurde die Resistenz im Färbungs- und im Entfärbungsversuch in allen Fällen übereinstimmend stark herabgesetzt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 17.

(*Daucus;* Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen.)

Anzahl lebender und toter Zellen nicht, wie üblich, nach der 2. Plasmolyse ermittelt, sondern nach der 2. Deplasmolyse in Pyroninlösung! 1. und 2. Plasmolyse in 1,2 mol Traubenzucker.

Versuchsdatum	Dauer der			1. Deplasmolyse in mol Traubenzucker	% der überlebenden Zellen
	Wässerung	Vorfärbung	Wässerung nach Färbung		
4. 10. 1949	2 Std. 35 Min.	—		Wasser	4 Schnitte 100
	10 Min.	2 Std. 35 Min.	—	Farblösg.	60
			—		40 } Mittel 37
	”		—	”	10
	2 Std. 35 Min.	—		0,1	—
	10 Min.	2 Std. 35 Min.	—		60
			—		50 } Mittel 52
	”		—	”	45
	2 Std. 35 Min.		—	0,3	—
	10 Min.	2 Std. 35 Min.	—		95
			—		85 } Mittel 83
	”		—		80
	2 Std. 35 Min.	—	—	0,5	—
	10 Min.	2 Std. 35 Min.	—		95 } Mittel 87
”	”		—		80
5. 10. 1949	21 Std.	—	—	Wasser	99
		—	—		99 } Mittel 96
		—	—		95
	”	—	—		90
	10 Min.	2 Std.	19 Std.		15
					2 } Mittel 6
	”			”	1
	21 Std.	—	—	0,1	99
		—	—		99 } Mittel 98
	”	—	—		97
	10 Min.	2 Std.	19 Std.		30
					1 } Mittel 11
	”			”	1
	21 Std.	—	—	0,3	2 Schnitte 100
	10 Min.	2 Std.	19 Std.		60
					45 } Mittel 40
	”			”	15
	21 Std.	—	—	0,5	—
	10 Min.	2 Std.	19 Std.		85
					50 } Mittel 46
					10

Tradescantia albiflora Kunth.

Färbungsbild. Nach 15 Minuten Färbung Schnitte im Hellfeld sehr schwach gefärbt, im UV-Licht zeigten die meisten eine deutliche gelbgrüne Plasmafluoreszenz (23 le), in manchen Fällen fehlte sie trotz Hellfeldfärbung; Kerne und Vakuolen fluoreszierten nicht, die Membranen wiesen nur blaugrüne Eigenfluoreszenz auf. Nach $^3/_4$stündiger Färbung auch bei Hellfeldbeobachtung das Plasma, ferner die Kerne und Vakuolen deutlich gefärbt; die Membranen blieben stets farblos. Mit 3stündigem Verweilen im Farbbad war das Färbungsmaximum erreicht (Hellfeld: 13 ga), die Gesamtfärbung aber immer noch recht mäßig. Plasmafäden und Strömung (in den gefärbten Schnitten langsamer als in den Kontrollen) waren zu beobachten. Nach 1tägiger Färbung waren auch die Leukoplasten gefärbt, Vermehrung und netzartige Verdichtung der Plasmafäden um den Kern (vgl. S. 799) fiel auf; die Plasmaströmung war nunmehr erloschen.

Tabelle 18.
(*Tradescantia;* Viskosität.)

Versuchsdatum	Plasmolytikum in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Rundungszeiten in Min.
7. 12. 1949	0,25	30 Min.	—	20
			—	25
			—	25
			—	25
			—	25
			—	26
				Mittel 24,3
		5 Min.	30 Min.	25
				28
				30
				31
				31
				37
				42
				44
				Mittel 33,5
9. 12. 1949		40 Min.	—	15
			—	16
			—	18
			—	21
			—	23
			—	30
				Mittel 20,5
		5 Min.	40 Min.	8 Schnitte > 30

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Reversibilität der Färbung. Beim Übertragen 15 und 75 Minuten gefärbter Schnitte in Wasser nahm die Färbung zunächst rasch ab, vollständige Entfärbung trat bis zum Absterben der Zellen nicht ein. Nach 5tägiger Wässerung waren in 15 Minuten gefärbten Schnitten — ebenso wie in den Kontrollen — nahezu alle Zellen tot.

Viskosität. Sowohl der Vergleich der Plasmolyseformen gewässerter und gefärbter Schnitte 10 Minuten nach dem Einlegen in das Plasmolytikum wie auch der Rundungszeiten (Tabelle 18) ließ eine deutliche Viskositätserhöhung durch die Färbung erkennen.

Permeabilität.

Tabelle 19.

(*Tradescantia;* Permeabilität.)

Versuchs datum	Plasmolytikum in mol	Osmot. Wert in mol Traubenzucker	Dauer der Wässerung	Dauer der Vorfärbung	Deplasmolysezeit in Min.	P'_d	
7. 12. 1949	0,25 Harnstoff (ungefärbt)	0,225	30 Min.	—	14	0,451	Mittel 0,374
				—	15	0,421	
				—	16	0,395	
				—	16	0,395	
				—	18	0,351	
				—	19	0,332	
				—	19	0,332	
				—	20	0,316	
	0,25 Harnstoff (gefärbt)		5 Min.	30 Min.	19	0,332	Mittel 0,241
					22	0,287	
					28	0,225	
					29	0,217	
					30	0,210	
					30	0,210	
					26	0,243	
					31	0,204	
3. 12. 1949	0,3 Glyzerin (ungefärbt)	0,224	65 Min.	—	16	1,09	Mittel 0,854
				—	19	0,916	
				—	21	0,830	
				—	21	0,830	
				—	22	0,794	
					22	0,794	
				—	24	0,727	
	0,3 Glyzerin (gefärbt)		5 Min.	65 Min.	7 Schn. > 40	7 Schnitte $< 0,436$	

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, wurde die Permeabilität für Harnstoff wie für Glyzerin durch die Färbung stark herabgesetzt.

Die nur orientierenden Versuche über die Wirkung der Prune-pure-Färbung auf die Hitzeresistenz und die Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen lassen erwarten, daß kein Unterschied zwischen gefärbten und gewässerten Schnitten besteht.

Über die Fluoreszenz des Prune pure.

Wie eingangs erwähnt, zeigt eine wäßrige Prune-pure-Lösung keine Fluoreszenz, jedoch vermag das lebende Plasma (z. B. der Zwiebelschuppenepidermen) nach Färbung mit Prune pure zu fluoreszieren. Beobachtungen und Versuche, die diese Erscheinung dem Verständnis näherbringen können, sollen uns im folgenden Abschnitt eingehend beschäftigen.

1. Zusammenhang zwischen Plasmafluoreszenz lebender Gewebe und Sauerstofftension.

Größere Epidermisstücke der Außen- wie der Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* wurden bis zu gleichmäßiger Hellfeldfärbung in allen Schnitteilen gefärbt (1 : 10.000, p_H 7,1). Die Gewebe wurden mit einem Tropfen Farblösung sodann auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas bedeckt liegengelassen. Bereits nach kurzer Zeit (bei der IE nach etwa 15 Minuten, bei der AE nach längerer Zeit) war makroskopisch im Schnittinneren ein deutliches Ausblassen der Hellfeldfärbung nach Blaßgelb festzustellen; dieser Prozeß setzte sich rasch fort, und schließlich waren lediglich die Schnitträndер und die Zellgebiete um die etwa unter dem Deckglas eingeschlossenen Luftblasen gefärbt (Farbton in den entfärbten Teilen: 1 ca der Unesma-Farbtafeln). Bei mikroskopischer Beobachtung waren Plasma und Kerne (in der AE auch die Vakuolen!) der makroskopisch gelblich gefärbten Teile vollkommen farblos, ebenso die Membranen, nur an den Schnitträndern war die normale Hellfeldfärbung erhalten geblieben.

Im UV-Licht fluoreszierte in derartigen Schnitten das Plasma beider Epidermen in den im Hellfeld mehr oder weniger entfärbten Teilen außerordentlich grell gelbgrün (23 ia—24 lc), die Kerne waren darin als dunkle, nicht fluoreszierende Stellen ausgespart. Die Membranen und die Vakuolen zeigten keine Fluoreszenz.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Plasmaströmung und Konfiguration waren nach dieser Behandlung unverändert. Die unter Verlust der Hellfeldfärbung bei Luftabschluß erzielte Plasmafluoreszenz übertraf an Intensität bei weitem die nach bloßer Färbung erhaltene; sie war im Gegensatz zur normalen Plasmafluoreszenz an meinem Zwiebelmaterial stets in der gleichen Weise sicher zu reproduzieren.

Wurde das Deckglas von derartig entfärbten Schnitten wieder abgehoben, so war an der IE bereits nach 2 Minuten wieder eine deutliche Blaufärbung der vorher gelblichen Stellen wahrzunehmen, nach 8 Minuten zeigten die Schnittränder und die Schnittmitten wieder den gleichen blauvioletten Farbton (14 ea—gc). An der IE waren Plasma und Kerne wieder blauviolett gefärbt, jedoch etwas schwächer als vorher; merkwürdigerweise zeigten nunmehr auch die Vakuolen eine blaßblaue Färbung (der auf S. 799 beschriebenen vergleichbar). Die unter Verlust der Hellfeldfärbung verstärkte Plasmafluoreszenz hatte sich nunmehr wieder auf die ursprüngliche Intensität verringert. Das Plasma aller Zellen strömte bei völlig ungeschädigtem Aussehen recht lebhaft. Wurden die Epidermisstücke erneut mit einem Deckglas bedeckt und längere Zeit liegengelassen, so wiederholte sich der beschriebene Vorgang aufs neue.

Sehr instruktiv gestaltete sich folgender Versuch: Epidermisstücke der AE oder IE, die man auf die beschriebene Weise zum Verlust der Hellfeldfärbung und Steigerung der Fluoreszenz gebracht hatte, zeigten beim Durchsaugen einer verdünnten, unschädlichen Lösung von H_2O_2 nicht näher bekannter Konzentration unter dem Deckglas mit dem Vordringen der Lösung schlagartigen Verlust der Fluoreszenz unter gleichzeitiger Sauerstoffentwicklung (Gasbläschen). Wurde der gleiche Versuch im Hellfeld ausgeführt, so brachte das Durchsaugen der Wasserstoffsuperoxydlösung eine Blaufärbung der Schnitte mit sich. Für die Vitalität dieses Vorganges spricht die Plasmaströmung aller Zellen nach dem Versuch; selbst ein zweites Mal konnte dieser Prozeß wiederholt werden, ohne zum Absterben der Zellen zu führen (vgl. auch Pfeffer, 1889).

Schnitte, die unmittelbar nach 10 Minuten Farbbadbehandlung in Wasserstoffsuperoxydlösung gebracht worden waren, zeigten wohl Verlöschen der Fluoreszenz, aber keine Veränderung der Hellfeldfärbung.

2. Abhängigkeit der Plasmafluoreszenz vom Lebenszustand der Zellen.

50 Minuten gefärbte Schnitte der beiden Zwiebelepidermen mit guter Plasmafluoreszenz wurden auf einen Objektträger gebracht,

mit einem Deckglas bedeckt, mehrmals durch die Flamme gezogen und sofort beobachtet; in lebenden Zellen war die Fluoreszenz erhalten geblieben, in nekrobiotischen deutlich geschwächt und in toten fehlte sie gänzlich (im Hellfeld waren Plasma und Kerne aller Zellen der IE zunächst noch gefärbt).

Beim Übertragen von IE-Schnitten mit guter Plasmafluoreszenz in 1,0 mol Traubenzucker, anschließender Deplasmolyse in Pufferlösung und erneuter Plasmolyse in 1,0 mol Zucker, waren nach der zweiten Plasmolyse fast alle Zellen tot; ihnen fehlte auch jede Plasmafluoreszenz (im Hellfeld waren Plasma und Kerne zunächst noch gefärbt).

3. Fluoreszenz der Farblösungen.

Wie erwähnt, zeigt eine Prune-pure-Lösung in der Konzentration von 1 10.000 bei p_H 7,1 (Phosphatpuffer) im UV-Licht keinerlei Fluoreszenz (mit gleichfalls negativem Ergebnis wurde destilliertes Wasser, Pufferlösung und Rongalitlösung geprüft). Stark saure (HCl) und stark alkalische (tertiäres Phosphat) Farblösungen zeigten wohl andere Hellfeldfarben (Rot bzw. Rotviolett), fluoreszierten aber nicht.

Wurde eine Eprouvette mit Farblösung (1 : 10.000, p_H 7,1) gefüllt und mit einem Reduktionsmittel (etwa einer Messerspitze Rongalit oder einer etwas größeren Menge Na-Thiosulfat, $Na_2S_2O_3$) versetzt, so war nach Lösung des Rongalits im Hellfeld wie im UV-Licht keine Veränderung zu bemerken. Erst beim Erhitzen dieses Gemisches trat an Stelle der gewohnten Blaufärbung des Prune pure eine blasse, gelbliche Färbung (1—2 ia, 1 ca). Im UV-Licht zeigte die Lösung nunmehr eine schwache, schmutziggelbe (1 gc) Fluoreszenz, die sich beim Abkühlen der Lösung etwas verstärkte. Luftdichter Verschluß der — offenbar reduzierten — Lösung erhielt die gelbliche Hellfeldfärbung wie auch die Fluoreszenz unverändert, Durchschütteln mit Luft färbte die Lösung wieder blau, die Fluoreszenz ging verloren. Bei Verwendung von Leitungswasser oder destilliertem Wasser als Lösungsmittel für den Farbstoff war der beschriebene Versuch in gleicher Weise zu wiederholen.

Orientierend wurden stark saure (HCl) und stark alkalische (tertiäres Phosphat) Prune-pure-Lösungen geprüft: Die sauren, roten Farblösungen waren mit Rongalit schon bei schwachem Erwärmen rasch zu reduzieren, sie färbten sich beim Durchschütteln mit Luft nicht mehr rot, wohl aber vorübergehend bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxydlösung. Stark alkaliche, rotviolette Farblösungen ließen sich nur unter längerem, starkem Erhitzen redu-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

zieren und zeigten große Neigung zu erneuter Rotfärbung. In beiden Fällen fluoreszierten die leicht geblich gefärbten, reduzierten Lösungen stark gelbgrün.

Unbehandelte Farblösung (1 : 10.000, p_H 7,1) wurde mit einem gleichen Teil Xylol ausgeschüttelt: nach dem Absetzen war die lipoide Phase im Hellfeld intensiv blau gefärbt, die wäßrige nur schwach bläulich (vgl. Drawert, 1938). Im UV-Licht war nur die bläuliche Eigenfluoreszenz des Xylols wahrzunehmen.

Beim Ausschütteln einer durch Rongalit entfärbten Prune-pure-Lösung (p_H 7,1) mit gleichen Teilen von Xylol, Toluol, Benzol oder Chloroform war nach dem Absetzen im Hellfeld die lipoide Phase gelblich (1 ca) gefärbt (die verwendeten organischen Lösungsmittel waren im Hellfeld völlig farblos, ihre schwach bläuliche Eigenfluoreszenz fiel nicht störend ins Gewicht), die wäßrige Phase schwach blau (vermutlich durch Prune pure, das beim Ausschütteln mit Luft in Berührung gekommen war und dadurch wieder in seine blaugefärbte Form übergegangen ist). Im UV-Licht bot sich ein überraschendes Bild: Die wäßrige Phase zeigte keine Färbung, jedoch die lipoide fluoreszierte außerordentlich grell gelbgrün (24 lc; lediglich bei Verwendung von Chloroform gelb: 24—1 ia); die intensivste Fluoreszenz war beim Ausschütteln mit Toluol und Xylol zu beobachten, etwas schwächere mit Chloroform und Benzol[17]. Durch ein Gelbfilter betrachtet, erhielt man etwa den gleichen Farbton wie ihn das fluoreszierende Plasma lebender Zellen zeigte .

Die durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln erzielte Fluoreszenz des Prune pure war ganz bedeutend intensiver als die der wäßrigen Lösung vor dem Ausschütteln.

4. Wundrand und Plasmafluoreszenz.

Zwiebelschuppen wurden nach Infiltration mit farbloser Pufferlösung (p_H 7,1) mit einer Präpariernadel mehrmals durchstochen und in Farblösung (1 : 10.000, p_H 7,1) übertragen (vgl. Küsters Stichpunktversuche an ganzen Zwiebeln, 1934). Nach $1^1/_2$stündiger Färbung zeigte die nunmehr freipräparierte IE in allen Teilen gleichmäßige Hellfeldfärbung von Plasma und Kernen, die Zellen in Wundnähe zusätzliche schwache Vakuolenkontraktion. Im UV-Licht fluoreszierte das Plasma aller Zellen mit Ausnahme derer des

[17] Daß die Fluoreszenzfarbe wie auch -intensität vieler Fluorochrome im molekular gelösten Zustand in wäßrigen Lösungsmitteln anders ist als in organischen, ist bereits in der Literatur beschrieben (s. Strugger, 1949 b, S. 27).

Wundrandes. Nach Färbung von 2 Stunden 14 Minuten wurde auch die AE der gleichen Schuppe freipräpariert: Im Hellfeld waren ähnlich wie in den Stichpunktversuchen Küsters (1934) in 2—3 Zellreihen um die Stichpunkte Plasma und Vakuolen bei Vakuolenkontraktion gut gefärbt, in der nächstfolgenden Zone nur die Vakuolen, wobei die Färbung mit zunehmender Entfernung vom Stichpunkt schwächer wurde; in einer dritten Zone war schließlich überhaupt keine Farbstoffspeicherung mehr wahrzunehmen. Im UV-Licht fluoreszierten die Zellen unmittelbar um die Wunde nicht, in der nächstfolgenden Zone fluoreszierte das Plasma sehr kräftig, in der im Hellfeld gänzlich farblosen Zone war auch im UV-Licht keinerlei Färbung wahrzunehmen (offenbar war der Farbstoff nicht bis zu diesen Zellen vorgedrungen).

Es scheint demnach, daß die Stichpunkte dem Wundrand der auf gewöhnliche Weise präparierten Schnitte entsprechen.

*

Auf Grund der mitgeteilten Beobachtungen und Modellversuche dürfte die Plasmafluoreszenz lebender Zellen nach Prune-pure-Färbung so zu erklären sein, daß das Plasma den Farbstoff zu seiner im Hellfeld nur schwach gelblich gefärbten Form reduziert (Zaleski, 1910; Needham and Needham, 1926; Brooks and Moldenhauer Brooks, 1941; u. a.) und diese in den Plasmalipoiden gespeichert wird. Dabei steigert sich die Fluoreszensintenität stark und schafft vermutlich erst dadurch die Voraussetzung, die Plasmafluoreszenz überhaupt wahrzunehmen[18].

Plasmafluoreszenz nach Prune-pure-Färbung wurde nicht nur in den Zellen der Zwiebelepidermis beobachtet, sondern auch in den Stengelepidermiszellen von *Eranthis hiemalis*, *Vicia faba* und *Tradescantia albiflora*. Wurzelhaare von *Trianea bogotensis*, Blätter von *Elodea densa* und *E. canadensis* u. a. zeigten nach Prune-pure-Färbung keine Plasmafluoreszenz.

[18] Ähnliches Verhalten fand ich auch bei dem dem Prune pure chemisch nahestehenden Methylenblau (beide sind Chinonimidfarbstoffe). Analog dem Prune pure (die blaue Form fluoresziert nicht), zeigt auch das Leukomethylenblau deutliche aber schwache blaugrüne Fluoreszenz (22 ic—ia). Innenepidermen, die mit Methylenblau (1 : 10.000, Leitungswasser) gefärbt worden waren, entfärbten sich im Hellfeld bei Sauerstoffmangel unter dem Deckglas vollständig (im Gegensatz zur schwach gelblichen Färbung bei Prune pure), wobei im UV-Licht das bis dahin farblose Plasma deutliche Fluoreszenz annahm. Nach Zufuhr von Sauerstoff wurde die Plasmafluoreszenz binnen kurzer Zeit zum Verschwinden gebracht, während die Blaufärbung zunahm.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

IV. Zusammenfassung.

Hellfeldbeobachtungen:

1. Mit Prune pure färbten sich Plasma und Kerne stets in der inneren Zwiebelschuppenepidermis von *Allium cepa*, ferner in den Stengelepidermen von *Vicia* und *Tradescantia*, häufig auch in der äußeren Zwiebelschuppenepidermis von *Allium* und in der Stengelepidermis von *Eranthis*. Plasmafärbung war ferner bei *Taraxacum* zu beobachten, Leukoplastenfärbung bei *Tradescantia*. Diffuse Vakuolenfärbung zeigten die Außenepidermis, *Vicia, Daucus, Tradescantia, Eranthis* und *Taraxacum*. Die Membranen färbten sich an den Schnitträndern bei *Tradescantia* und *Eranthis* und an den toten Zellen von *Daucus*. Von *Amaryllis* und *Begonia punctata* färbte sich keiner der Zellteile. Krümelige Niederschläge waren in den lebenden Zellen von *Spirogyra* und in den toten von *Vicia, Eranthis* und *Daucus* zu finden.

Bei längerem Sauerstoffabschluß verschwindet vor allem im Schnittinneren größerer Gewebestücke die Blaufärbung und macht einer blassen Gelbfärbung Platz. Bei Sauerstoffzufuhr ist der Vorgang rückläufig.

2. Der Farbstoff wirkte in meinen Versuchen auf die oben angeführten Objekte nur sehr wenig schädigend.

3. Vollständig auswaschbar war in den Reversibilitätsversuchen nur die Hellfeldfärbung von Plasma und Kernen in der Innenepidermis und, soferne eine solche vorhanden war, auch in der Außenepidermis. Auffallend war das Auftreten einer leichten Färbung der vorher ungefärbten Vakuolen in der Innenepidermis bei länger dauerndem Wässern gefärbter Schnitte. Die Hellfeldfärbung des Plasmas von *Vicia* und *Tradescantia*, die Kernfärbung von *Tradescantia* und die Vakuolenfärbung der Außenepidermis, *Vicia, Daucus* und *Tradescantia* war durch Wässern nicht zu entfernen.

In allen Reversibilitätsversuchen lebten die gefärbten und anschließend gewässerten Schnitte länger als solche, die in der Farblösung belassen worden waren, aber kürzer als die gewässerten Kontrollen.

4. Die Viskosität des Plasmas wurde durch die Prune-pure-Färbung in den beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen, *Vicia, Daucus* und *Eranthis* vermindert, bei *Tradescantia* erhöht.

5. Die Permeabilität für Harnstoff wie für Glyzerin wurde bei allen untersuchten Objekten, das sind die beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen, *Vicia, Daucus, Tradescantia* und *Eranthis*, durch die Färbung gehemmt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

6. Die Hitzeresistenz wurde durch die Färbung bei der Innenepidermis und *Daucus* herabgesetzt, bei der Außenepidermis, *Vicia* und *Tradescantia* nicht beeinflußt.

7. Die Resistenz gegen osmotische Volumsänderungen wurde in der Innenepidermis, *Vicia* und *Daucus* durch das Prune pure vermindert, in der Außenepidermis und bei *Tradescantia* dagegen nicht verändert.

Fluoreszenzbeobachtungen:

1. Fluoreszenzfärbung nach Prune-pure-Behandlung wurde im Plasma der beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen, *Vicia*, *Tradescantia* und *Eranthis* beobachtet, ebenso im Kern von *Vicia* und *Eranthis*. Vakuolen wie Membranen fluoreszierten nach Prune-pure-Behandlung niemals. Plasmafluoreszenz war in den Wurzelhaaren von *Trianea bogotensis*, den Blättern von *Elodea densa* und *E. canadensis* u. a. nach Prune-pure-Behandlung nicht zu beobachten, wobei auch im Hellfeld das Plasma ungefärbt blieb.

2. Die Fluorenszenzfärbung des Plasmas der beiderseitigen Zwiebelschuppenepidermen war durch Wässern nicht auswaschbar.

3. Der im Hellfeld beobachteten Umfärbung von Blau nach Blaßgelb, welche mit Prune pure gefärbte Schnitte unter Sauerstoffmangel zeigen, geht eine starke Zunahme der Plasmafluoreszenz parallel. Durch Sauerstoffzufuhr wird die Plasmafluoreszenz stark vermindert, die Blaufärbung im sichtbaren Licht tritt wieder auf.

Die Fluoreszenzfärbung des Plasmas ist an dessen Lebenstätigkeit gebunden.

4. Die unbehandelte Farblösung (1 10.000, p_H 7,1) zeigt keine Fluoreszenz, auch nicht nach Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln.

Beim Erhitzen der Farblösung mit einem Reduktionsmittel (Rongalit, Natriumthiosulfat) tritt im Hellfeld Umfärbung von Blau nach Blaßgelb ein, wobei die nicht fluoreszierende Form des Prune pure in die schwach fluoreszierende übergeht; beim Abkühlen der Lösung verstärkt sich die schwache Fluoreszenz ein wenig.

Beim Ausschütteln der reduzierten Lösung mit organischen Lösungsmitteln geht die reduzierte Form des Prune pure (im p_H-Bereich um den Neutralpunkt) quantitativ in die lipoide Phase über, wobei eine enorme Steigerung der Fluoreszenzintensität erfolgt: der Farbton dieser Fluoreszenz entspricht dem der Fluoreszenzfärbung des lebenden Plasmas.

*

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die vorliegende Untersuchung wurde im Rahmen einer größeren, noch zu veröffentlichenden Versuchsreihe über den Einfluß weiterer Vitalfarbstoffe (Chrysoidin, Rhodamin B, Akridinorange und Pyronin) auf die verschiedenen Plasmaeigenschaften ausgeführt.

Es ergab sich für alle diese Farbstoffe wie für Prune pure, daß die Plasmaeigenschaften unter dem Einfluß der Vitalfärbung in der Mehrzahl der Fälle im Sinne einer Verminderung verändert werden, womit weder eine morphologische Veränderung der Zellen noch eine wesentliche Verkürzung der Lebensdauer verbunden sein muß. Die Farbstoffwirkung betrifft nicht immer alle untersuchten Plasmaeigenschaften, es können am gleichen Objekt die einen stark verändert werden, die anderen unverändert bleiben.

Es scheint, daß die Wirkung der (hier studierten basischen) Farbstoffe im Plasma mehr auf Grund ihrer gemeinsamen physikalisch-chemischen Eigenschaften zustande kommt als durch verschiedenartige chemische Bindung mit Strukturelementen des Plasmas.

V. Literaturverzeichnis.

Albach, W., 1929: Mikrorespirometrische Untersuchungen über den Einfluß der Vitalfärbung und der Plasmolyse auf die Atmung von Pflanzenzellen. Protoplasma **7**, 395.

Arnold, E., 1937: Vitalfärbung am Säugetierei. Protoplasma **29**, 321.

Bank, O., 1937: Die Vitalfärbung des Zellkernes mit basischen Farbstoffen. Protoplasma **29**, 587.

Beikirch, H., 1925: Die Abhängigkeit der Protoplasmaströmung von Licht und Temperatur und ihre Bedingtheit durch andere Faktoren. Bot. Archiv **12**, 389.

Biebl, R., 1950: Zellphysiologische Untersuchungen an Gemüsepflanzen. Biologia Generalis **19**, H. 2, 236.

Boriss, H., 1937: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen mit Thioninfarbstoffen. Protoplasma **28**, 23.

— 1938: Plasmolyseform und Streckungswachstum. Jahrb. Bot. **86**, 784.

Brooks, S. C. and Moldenhauer Brooks, M., 1941: The Permeability of Living Cells. Protoplasma-Monographien **19**.

Derry, B. H. el, 1929: Plasmolyseform- und Plasmolysezeit-Studien. Protoplasma **8**, 1.

Döring, H., 1932: Beiträge zur Frage der Hitzeresistenz pflanzlicher Zellen. Planta **18**, 405.

Drawert, H., 1938: Über die Aufnahme und Speicherung des Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta **29**, 179.

Fischer, H., 1947: Plasmolyseform und Mineralsalzgehalt in alternden Blättern. I. Untersuchungen an *Helodea* und *Fontinalis*. Planta **35**, 513.

— 1949: Plasmolyseform und Mineralsalzgehalt in alternden Blättern. II. Mitteilg. Untersuchungen an Land- und Schwimmpflanzen. Planta **37**, 244.

Genevois, L., 1928: Coloration vitale et respiration. Protoplasma **4**, 67.
Grohrock, E., 1934: Über die Umhäutung isolierter Protoplasmastücke. Untersuchungen an *Saprolegnia*. Planta **23**, 313.
Haberlandt, G., 1920: Zur Physiologie der Zellteilung. V. Über das Wesen des plasmolytischen Reizes bei Zellteilungen nach Plasmolyse. Sitz.-Ber. preuß. Akad. Wiss., Berlin, Nr. 11, 323.
Höfler, K., 1943: Über die Fettspeicherung und Zuckerpermeabilität einiger Diatomeen und über Diagonal-Symmetrie im Diatomeenprotoplasten. Protoplasma **38**, 71.
— 1947: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **156**, 585.
— 1949: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Mikroskopie **1**, 46.
Höfler, K. und Stiegler, A., 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie **2**, 250.
Höfler, K., Toth, A. und Luhan, M., 1949: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase? Protoplasma **39**, 62.
Hofmeister, L., 1938: Studien über die Permeabilität vitalgefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau. Zeitschr. wiss. Mikr. **55**, 393.
— 1948 a: Über die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **157**, 83.
— 1948 b: Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **157**, 55.
Houska, H., 1939: Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. Österr. bot. Zeitschr. **88**, 161.
Karzel, R., 1926: Über die Nachwirkungen der Plasmolyse. Jahrb. wiss. Bot. **65**, 551.
Küster, E., 1926: Über vitale Protoplasmafärbung. Zeitschr. wiss. Mikr. **43**, 378.
— 1934: Über die Färbung lebenden Protoplasmas von Pflanzenzellen mit Prune pure. Zeitschr. wiss. Mikr. **50**, 409.
Needham, J. and Needham, D. M., 1926: The oxydation-reduction Potential of Protoplasm. Protoplasma **1**, 255.
Pekarek, J., 1928: Über die Wirkung von Nitraten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen und Zellsäfte mit Azur I. Protoplasma **30**, 161.
Pfeffer, W., 1886: Untersuchungen aus dem Botanischen Institut Tübingen **2**, 179.
— 1889: Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. Abhandlg. math.-physik. Kl. d. königl. sächs. Ges. d. Wiss. Leipzig, S. Hirzel.
Ruge, U., 1940: Kritische zell- und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Blattzähnen von *Helodea densa*. Flora **134**, 311.
Ruhland, W., 1908 a: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Jahrb. wiss. Bot. **46**, 1.
— 1908 b: Die Bedeutung der Kolloidnatur wäßriger Farbstofflösungen für ihr Eindringen in die lebende Zelle. Ber. d. D. Bot. Ges. **26a**, 772.
— 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. wiss. Bot. **51**, 376.
— 1923: Über die Verwendbarkeit vitaler Indikatoren zur Ermittlung der Plasmareaktion. Ber. d. D. Bot. Ges. **41**, 252.

Scarth, G. W., 1926: The influence of external osmotic pressure and of disturbance of the cell surface on the permeability of *Spirogyra* for acid dyes. Protoplasma **1**, 204.
Schaede, R., 1923: Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. II. Ber. d. D. Bot. Ges. **41**, 345.
Scheibmair, G., 1937: Hitzeresistenz-Studien an Moos-Zellen. Protoplasma **29**, 394.
Scheitterer, H. und Weber, F., 1930: Hypotonietod von Pflanzenzellen. Protoplasma **10**, 474.
Schneider, E., 1925: Über die Plasmolyse als Kennzeichen lebender Zellen. Zeitschr. wiss. Mikr. **42**, 32.
Schönleber, K., 1936: Über Prune pure und seine Verwendbarkeit als Protoplasma-Vitalfärbemittel. Zeitschr. wiss. Mikr. **53**, 303.
Stiegler, A., 1950: Vitalfärbungen an Pflanzenzellen mit Cresylechtviolett. Protoplasma **39**, 493.
Strugger, S., 1931: Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. Ber. d. D. Bot. Ges. **49**, 453.
— 1935: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. Borntraeger, Berlin.
— 1936: Die Vitalfärbung der Cloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. Flora **131**, 113.
— 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. Protoplasma **30**, 85.
— 1940 a: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Zeitschr. f. Nat. Wiss. **73**, 97.
— 1940 b: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma **34**, 601.
— 1949 a: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. 2. Aufl., Springer, Berlin.
— 1949 b: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. u. H. Schaper, Hannover.
Unesma-Farbtafeln. 1933. Verlag Unesma G. m. b. H., Großbothen i. S.
Walter, H., 1923: Protoplasma- und Membranquellung bei Plasmolyse. Untersuchungen an *Bangia fusco-purpurea* und anderen Algen. Jahrb. wiss. Bot. **62**, 145.
Weber, F., 1921: Das Fadenziehen und die Viskosität des Plasmas. Österr. bot. Zeitschr. **70**, 172.
— 1924: Plasmolyseform und Protoplasmaviskosität. Österr. bot. Zeitschr. **73**, 261.
— 1925: Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform. Untersuchungen an *Spirogyra*. Zeitschr. wiss. Mikr. **42**, 146.
— 1928: Plasmolyse-Zeit-Methode. Protoplasma **5**, 622.
— 1929 a: Plasmolysezeit und Lichtwirkung. Protoplasma **7**, 256.
— 1929 b: Zentrifugierung und Protoplasma-Viskosität. Protoplasma **7**, 444.
— 1929 c: Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma **9**, 106.
Weis A., 1924: Beiträge zur Kenntnis der Plasmahaut. Planta **1**, 145.
Zaleski, W., 1910: Über die Rolle der Reduktionsprozesse bei der Atmung der Pflanzen. Ber. d. D. Bot. Ges. **28**, 319.